

EXTRACTION OF ACTIVE INGREDIENT IN CELL

Patent Number: JP63304990
Publication date: 1988-12-13
Inventor(s): TAKEBE HIDEAKI; others: 07
Applicant(s):: MEIJI SEIKA KAISHA LTD; others: 01
Requested Patent: ☐ JP63304990
Application Number: JP19870140461 19870604
Priority Number(s):
IPC Classification: C12P1/02 ; C12N9/42 ; C12P1/00 ; C12P7/64
EC Classification:
Equivalents: JP1876088C, JP5087236B

Abstract

PURPOSE: To efficiently extract an active ingredient in cells from a mold containing chitosan in a cell wall, by using chitosanase, a cell wall dissolving enzyme.

CONSTITUTION: A mold belonging to the order Mucorales or Morillales is cultivated in an agar medium to form a spore, which is transplanted to a liquid medium and the mold is multiplied to accumulate an active ingredient in the cell. The prepared cell is directly dispersed in an aqueous solution or a buffer solution or washed and dispersed, mixed with a cell wall dissolving enzyme containing chitosanase derived from *Bacillus pumilus* BN-262 (FERM P-8814) and slowly shaken at 30-40 deg.C for 6-8hr to extract the active ingredient. beta-1,3- Glucanase, cellulase or chitinase may be used as the cell wall dissolving enzyme except chitosanase.

Data supplied from the esp@cenet database - 12

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭63-304990

⑬ Int. Cl.

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和63年(1988)12月13日

C 12 P 1/02
C 12 N 9/42
C 12 P 1/00Z-6807-4B
8828-4B
A-6807-4B

※審査請求 未請求 発明の数 1 (全4頁)

⑮ 発明の名称 菌体内有効成分の抽出方法

⑯ 特 願 昭62-140461

⑰ 出 願 昭62(1987)6月4日

特許法第30条第1項適用 昭和62年3月10日 社団法人日本農芸化学会発行の「昭和62年度日本農芸化学会大会講演要旨集」に発表

⑱ 発 明 者 武 部 英 日 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製菓株式会社薬品開発研究所内

⑲ 発 明 者 松 信 俊 男 神奈川県川崎市幸区堀川町580番地 明治製菓株式会社薬品開発研究所内

⑳ 出 願 人 明治製菓株式会社 東京都中央区京橋2丁目4番16号

\textcircled{21} 代 理 人 弁理士 久保田 藤郎

\textcircled{22} 出 願 人 工業技術院長 東京都千代田区蔵が関1丁目3番1号

\textcircled{23} 復代理人 弁理士 久保田 藤郎

最終頁に続く

明 細 書

1. 発明の名称

菌体内有効成分の抽出方法

2. 特許請求の範囲

(1) 細胞壁にキトサンを有する糸状菌より菌体内有効成分を抽出するに際し、細胞壁溶解酵素キトサナーゼを使用することを特徴とする菌体内有効成分の抽出方法。

(2) 細胞壁にキトサンを有する糸状菌がムコラレス(*Mucorales*)目またはモリリアレス(*Morillales*)目に属するものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

(3) キトサナーゼがバチルス・パミルス(*Bacillus pumilus*) strain 262 (FERM P-8814) の生産するものである特許請求の範囲第1項記載の方法。

3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は菌体内有効成分の抽出方法に関し、詳しくはキトサナーゼを使用して糸状菌より菌体内有効成分を抽出する方法に関する。

糸状菌は酵母と共に発酵液による食品、医薬品等の製造に古くから利用されているが、糸状菌を生育せしめて菌体に各種の有効成分を生産せしめる技術の開発と相俟って、これら糸状菌より有効成分を効率よく抽出する方法が益々求められる傾向にある。

〔従来の技術〕

糸状菌より菌体内有効成分を抽出する前処理としての細胞壁の破壊、溶解に関しては化学的方法、物理的方法および酵素的方法(特開昭60-75281、同60-164477、同61-7318号公報)が知られている。

〔発明が解決しようとする課題〕

しかしながら、糸状菌は大腸菌などの細菌と異なり堅固な細胞壁を有するため、これを破壊、溶解することは容易でない。

そのため、従来より提案されている高温処理、強酸・強アルカリ処理、溶剤処理等による細胞壁の分解や超音波処理、機械的処理(ボールミル、ホモジナイザー、パンダムミルなど)等の細胞壁

の破壊は、細胞壁の分解、酸酵が十分でなかったり、また必然的に菌体内有効成分の消耗破壊を免れ得ないものであった。

このような状況下、酵素を使用して細胞壁を分解する方法が注目を集めている。糸状菌細胞壁の溶解に関与する酵素としては各種微生物起源のものが知られているが、これらの酵素は必ずしも満足しうるものとは云い難い。特に細胞壁にキトサンを有する糸状菌よりの菌体内有効成分の抽出に際しては、市販のセルラーゼ、キチナーゼ、 β -1,3-グルカナーゼ等の細胞壁溶解酵素を用いた場合、抽出が効率よく行われず、糸状菌の菌体内有効成分の利用に大きな障害となっていた。

本発明は、細胞壁溶解酵素キトサナーゼを用いて効率よく糸状菌の菌体内有効成分を抽出する方法に関する。

(問題点を解決するための手段)

本発明者らは、糸状菌の菌体内有効成分を効率よく抽出する方法について検討を重ねた結果、細胞壁溶解酵素キトサナーゼを使用することによ

て温和な条件で菌体内有効成分の消耗破壊を避けることなく、効率よく抽出できることを見出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、細胞壁にキトサンを有する糸状菌より菌体内有効成分を抽出するに際し、細胞壁溶解酵素キトサナーゼを使用することを特徴とする菌体内有効成分の抽出方法に関する。

本発明に用いるキトサナーゼとしてはその起源を問わず、キトサナーゼを生産する微生物に由来するものが任意に使用できる。また、これら微生物の変種もしくは変異株を起源とするものであってもよい。たとえば特願昭61-207780号明細書に記載のキトサナーゼがある。キトサナーゼとしては該酵素生産菌の培養液あるいはその培養液を濾過したもの、あるいはエタノール、アセトン等の溶媒を添加して得られた粗酵素粉末、該粉末を水または緩衝液に溶解したもの、ゲル濾過法、イオン交換法等により分離された活性区分など様々な形態のものを使用することができる。

次に、糸状菌としては細胞壁にキトサンを有するものであればよく、たとえばムコラレス(*Mucorales*)目に属する糸状菌があり、具体的にはリゾーブス属、ムコール属、モルチイエレラ属等に属する糸状菌およびモリリアレス(*Morillales*)目に属する糸状菌、たとえばトリコデルマ属に属する糸状菌が挙げられる。

本発明を実施するにあたり、まず糸状菌を適当な培地、たとえば菌体培地(寒天培地)上培養して胞子を形成させ、この胞子を液体培地に移植し、菌体を増殖させ、菌体内に食品、医薬品等の分野において有用な有効成分を蓄積せしめる。得られた菌体をそのまま、あるいは洗浄したのち水溶液または緩衝液に懸濁し、これに予め調製したキトサナーゼを含む細胞壁溶解酵素を任意の順序で添加し、25〜45℃、好ましくは30〜40℃で4〜12時間、好ましくは6〜8時間ゆるやかに振とうする。ここで、キトサナーゼ以外の細胞壁溶解酵素としては既知のものを任意に使用でき、たとえば β -1,3-グルカナーゼ、セルラーゼ、

キチナーゼ等の酵素を単独でもしくは2種以上組合せてキトサナーゼと共に使用することができる。なお、これら酵素についても、その起源は問わない。

(実施例)

次に、本発明を実施例により説明するが、これらは本発明の範囲を何ら制限するものではない。

実施例1

モルチイエレラ・イサベリナ(*Mortierella isabertia*)IFO 8187をMY寒天培地(酵母エキス3g、ポリペプトン5g、麦芽エキス3g、グルコース10g、水1gおよび寒天20gからなる)上において、25℃で1週間培養し胞子を形成させた。これに生理食塩水を加えて胞子懸濁液を調製し、この胞子懸濁液を水1g当たりグルコース200g、尿素6g、 KH_2PO_4 9g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1g、 NaCl 0.3g、麦芽エキス0.6g、酵母エキス0.6g、ペプトン0.3g、 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.03g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.004g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.0006g、

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.003g, $MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 0.003g, pH 5.5からなる液体培地に移植し、30℃で5日間通気攪拌培養させ、固体内にγ-リノレン酸を含む油脂を蓄積させた。

次いで、この培養プロセスから2回遠心・洗浄(0.2 M酢酸バッファー)を繰返し、湿菌体を得た。この湿菌体1gを0.2 M酢酸バッファー(pH 5.6) 5000 mlに懸濁し、バチルス・パシルス BN-262 (FERM P-8814) の生産するキトサナーゼ粗酵素粉末(特開昭61-207780) ($8 \times 10^3 U$) を加え35℃で7時間ゆるやかに攪拌を行なった。反応終了後、吸引濾過により固体を分離し、真空下40℃で12時間乾燥を行なった。この乾燥固体にn-ヘキサン2500 mlを加え、室温で3時間攪拌を行ない固体よりn-ヘキサンへ油脂抽出を行なった。さらに、このn-ヘキサン溶液を減圧濃縮し105gのγ-リノレン酸含有油脂を得た。

比較例として、同様の方法で市販の細胞壁溶解酵素セルラーゼ($1.6 \times 10^4 U$)、キチナーゼ(シグマ社製) ($4 \times 10^4 U$) およびβ-グルクロニ

ダーゼ(シグマ社製) ($4 \times 10^4 U$) を混用添加した場合、γ-リノレン酸含有油脂の収率は63gであり、セルラーゼ($1.6 \times 10^4 U$) とβ-グルクロニダーゼ($4 \times 10^4 U$) を混用添加した場合は48gであり、全く酵素を加えない場合は35gであった(第1表参照)。

実施例2

実施例1と同様の方法でキトサナーゼ($4 \times 10^3 U$) とキチナーゼ(シグマ社製) ($4 \times 10^3 U$) との併用の場合は124gのγ-リノレン酸含有油脂を得た。

本実施例に用いたキトサナーゼ粗酵素粉末の調製法は下記のように実施した。バチルス・パシルス BN-262 (FERM P-8814) の培養液を遠心分離(6000 rpm)して固体を除去し、培養上澄液を得た。これに80%飽和になるように硫酸アンモニウムを加え、生じた塩析沈降物をセロファンチューブで充分透析後、凍結乾燥して粗酵素粉末を得た。

実施例3

実施例2と同様の方法であるが、用いた固体は洗浄を行わず、また0.2 M酢酸バッファーは用いず水に懸濁して反応処理を実施した。その結果、得られたγ-リノレン酸含有油脂量は121.5gであった。

(発明の効果)

本発明によれば、細胞壁にキトサンを有する菌株より固体内有効成分を効率よく簡単に抽出することができる。したがって、本発明の方法は食品、医薬品等として有用な物質の製造に広く利用できる。

特許出願人 明治製菓株式会社

工業技術院長

代理人 弁護士 久保田 隆 郎



第1表

方 法	固 体	γ-リノレン酸含有油脂量(g)
従来法	無添加	35
従来法	セルラーゼ、β-グルクロニダーゼ ($1.6 \times 10^4 U$) ($4 \times 10^4 U$)	48
従来法	セルラーゼ、β-グルクロニダーゼ、キチナーゼ ($1.6 \times 10^4 U$) ($4 \times 10^4 U$) ($4 \times 10^3 U$)	63
本発明法	キトサナーゼ ($8 \times 10^3 U$)	105
本発明法	キトサナーゼ、キチナーゼ ($4 \times 10^3 U$) ($4 \times 10^3 U$)	124

第1頁の続き

⑤Int.Cl. ¹			識別記号	庁内整理番号
C	12	P	7/64	7236-4B
/(C	12	P	1/02	
C	12	R	1:645)	
(C	12	N	9/42	
C	12	R	1:07)	
(C	12	P	1/00	
C	12	R	1:07)	

⑫発明者	佐藤	篤行	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑬発明者	蛭田	修	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑭発明者	魚谷	和道	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑮発明者	中川	幸二	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑯発明者	渡辺	宰男	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内
⑰発明者	深津	俊三	神奈川県川崎市幸区堀川町580番地	明治製菓株式会社薬品開発研究所内